Versuche zur Lokalisation einiger Fermente in den verschiedenen Zellbestandteilen der Spinatblätter

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

genehmigt von der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

Von

Gerhard Krossing

aus Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 13. März 1940

Tag der Promotion: 26. Juli 1940

Berlin 1940

Referenten: Professor Dr. K. Noack

Professor Dr. L. Diels

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderabdruck aus der „Biochemischen Zeitschrift", Band 305, Heft 5/6

Verlag von Julius Springer in Berlin

Einleitung.

Durch die Untersuchungen von *Noack* (1927) und die daran anschließenden von *Menke* (1937) ist es möglich geworden, einige Hauptbestandteile der Blattzellen von Spinat in Mengen zu isolieren, die eine chemische Analyse dieser Fraktionen zulassen. Die Fraktionen sind: Chloroplastensubstanz bzw. intakte Chloroplasten, Cytoplasmasubstanz und die wasserlösliche Fraktion. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Lokalisierung einiger Fermente in diesen Fraktionen.

Da eine Trennung der Zellbestandteile in möglichst schonender Weise herbeigeführt werden mußte, um die volle Wirksamkeit der Fermente zu erhalten, wurde die Darstellung der Fraktionen nach der von *Menke* (1937) angegebenen Methode der Fällung mit Kohlendioxyd ausgeführt. In einigen Punkten mußte jedoch die Methode infolge der Problemstellung etwas abgeändert werden.

Darstellung der Zellbestandteile.

500 g gereinigte Spinatblätter („Flämische Riesen“ und „König von Dänemark“) wurden in einer Porzellanreibschale zerrieben, mit destilliertem Wasser aufgenommen und im Koliertuch mit der Hand abgepreßt. Der Rückstand wurde noch zweimal mit destilliertem Wasser aufgerührt und wieder abgepreßt, derart, daß die gesamte Flüssigkeitsmenge 1 Liter betrug. Der Rückstand, der Zellwandsubstanz und noch unzerstörte Zellen enthielt, wurde nach Zugabe von Quarzsand in der Reibschale weiter zerkleinert und nach anhaltendem Auswaschen getrocknet.

In den Extrakt, der zur Entfernung der Zellkerne und Zellkernfragmente kurz vorzentrifugiert war, wurde zur Fällung der Chloroplastensubstanz im Eisschrank Kohlendioxyd eingeleitet, bis ein p_H-Wert von 5,8 erreicht war. Hierauf wurde durch Hartfilter im Eisschrank filtriert. Die nach 24 Stunden nicht durchgelaufene Flüssigkeit wurde

verworfen. Das klare braungefärbte Filtrat wurde zur Fällung der Cytoplasmasubstanz tropfenweise unter Umschwenken mit 5 n-Essigsäure versetzt, bis die Essigsäurekonzentration 0,5 n war und zum Absetzen 1 Stunde in den Eisschrank gestellt. Die so erhaltenen Fraktionen von Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz wurden unter Vereisen im Vakuum einer Ölpumpe von 1 bis 2 mm Hg über Phosphorpentoxyd getrocknet und, falls sie nicht sofort zu Fermentuntersuchungen verwendet wurden, in Reagensgläser eingeschmolzen und im Dunkeln aufbewahrt.

Das Restfiltrat, enthaltend die wasserlösliche Fraktion, war anfangs goldgelb und klar, trübte sich aber nach kurzer Zeit. Diese Trübung bestand in erster Linie aus anorganischen Substanzen. Die üblichen Eiweißreagenzien zeigten nur noch geringe Mengen Eiweiß an. Das Restfiltrat, dessen p_H-Wert 3,5 betrug, wurde mit Thymol, das auf die untersuchten Fermente keinen Einfluß ausübt, versetzt und im Eisschrank aufbewahrt.

Da *Menke* in einer neueren Arbeit (1938) über die Verbesserung seiner Methode gefunden hat, daß die Chloroplastensubstanz noch wechselnde Mengen Cytoplasmasubstanz enthält, sind die in dieser Arbeit angegebenen Werte in bezug auf die Chloroplastensubstanz um diese Differenz zu niedrig. Es folgt daraus, daß die Chloroplastensubstanz noch wirksamer ist, als in den Zahlenwerten angegeben wurde. Bei allen Fermentuntersuchungen wurden Kochsaftkontrollen ausgeführt.

Untersuchungen.

I. Katalase.

Für die ersten Untersuchungen wurden Gärröhrchen verwendet. Es gelangten jeweils 5 ccm der 0,5%igen Suspensionen, die mit 10 ccm Phosphatpuffer ($p_H = 6{,}8$) verdünnt wurden, zur Verwendung. Zunächst wurden 0,5 ccm einer 1,55 mol. H_2O_2-Lösung (aus Perhydrol *Merck* hergestellt) in die Gärröhrchen einpipettiert und dann die Flüssigkeiten hinzugegeben. Nach dem Mischen betrug die Konzentration des Hydroperoxyds $^1/_{100}$ mol. Es mußte sehr schnell gearbeitet werden, da die Sauerstoffentwicklung bei den Suspensionen von Chloroplastensubstanz sehr plötzlich einsetzte.

Um eine einigermaßen quantitative Übersicht zu bekommen, wurden mit Hilfe einer Stoppuhr in kurzen Zeitabständen die entwickelten Sauerstoffmengen am graduierten Schenkel abgelesen.

Tabelle I zeigt, daß die Sauerstoffentwicklung bei den Suspensionen von Chloroplastensubstanz sehr schnell erfolgte, während sie bei den Suspensionen aus Cytoplasmasubstanz nur sehr langsam einsetzte. Nach 24 Stunden war jedoch in den Gärröhrchen auch von der

Tabelle I. Katalase.

$t = 20^0$; $p_H = 6{,}8$; m/100 H_2O_2. Mittelwerte aus drei Parallelbestimmungen.

Ablesung nach	1 g Zellwand-substanz	0,025 g Chloro-plastensubstanz	0,025 g Cyto-plasmasubstanz	15 ccm Restfiltrat (wasserl. Substanz)
	entwickelte Menge O_2 in ccm			
3 Min.	3,05	2,60	0,65	0,00
6 „	3,65	3,35	1,75	0,01
12 „	4,0	4,0	2,10	0,01
24 Std.	4,15	4,65	3,65	0,01

Cytoplasmasubstanz annähernd dieselbe Sauerstoffmenge entwickelt. Das Restfiltrat, enthaltend die wasserlösliche Fraktion, zeigte keine Sauerstoffentwicklung.

Zur Orientierung wurde auch die die Zellwandsubstanzen enthaltende Fraktion untersucht, die zur Erreichung sicherer Werte in 40mal größerer Menge als die Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz verwandt werden mußte. Die hierbei gefundene katalatische Aktivität ist wohl größtenteils auf die der Zellwandsubstanz beigemischten, dem Zerreiben entgangenen intakten Zellen zurückzuführen.

Um zu prüfen, wie sich die Katalase bei einer Autolyse verhält, wurden Autolysate angesetzt und in gewissen Zeitabständen auf ihre Wirksamkeit untersucht. Es wurden jeweils 250 g Spinatblätter unter Zugabe von Quarzsand in der Porzellanreibschale zerrieben und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter gebracht. Die Autolysate wurden bei Zimmertemperatur in einer Flasche aus Jenaer Glas mit Thymolzusatz im Dunkeln gehalten. Die anfangs dunkelgrüne Farbe ging allmählich in hellgrün über, je weiter die Autolyse vorschritt.

In zuerst kurzen, dann längeren Zeitabständen wurden je 10 ccm Autolysat auf Katalase untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß dieses Ferment sich im Verlauf der Autolyse als sehr resistent erwies (Tabelle II). Noch nach 4 Monaten konnte fast dieselbe Sauerstoffmenge wie zu Beginn der Autolyse aus Wasserstoffperoxyd erhalten werden.

In denselben Zeitabständen wurden p_H-Messungen ausgeführt, die zeigten, daß schon nach 24 Stunden ein merkliches Absinken des p_H-Wertes erfolgt war. Tabelle II gibt die p_H-Werte einer Versuchsreihe an, die in einem Zeitraum bis zu 4 Monaten gemessen wurden. Der p_H-Wert sank bis zu einem bestimmten Säuregrad ab, blieb kurze Zeit ziemlich konstant und fing wieder zu steigen an bis ins schwach alkalische Gebiet.

Für quantitative Bestimmungen wurden manometrische Messungen im *Warburg*-Apparat ausgeführt. Zur Verwendung kamen

Tabelle II. Katalase. Autolysat von Blätterextrakt.
10 ccm Autolysat; $p_H = 6{,}8$; $t = 20^0$; m/100 H_2O_2. Mittelwerte aus drei Parallelbestimmungen.

Ablesung nach	Alter des Autolysats									
	0 Std.	24 Std.	48 Std.	6 Tage	8 Tage	14 Tage	3 Wochen	1 Monat	2 Monate	4 Monate
	entwickelte Menge O_2 in ccm									
3 Min.	4,05	3,95	3,85	2,85	2,75	2,55	2,35	2,35	2,25	2,15
6 „	4,25	4,05	4,0	3,25	3,10	3,20	3,25	2,95	2,95	3,05
12 „	4,55	4,35	4,15	3,35	3,35	3,35	3,35	3,25	3,20	3,10
24 Std.	5,15	4,85	4,85	4,85	4,85	4,75	4,65	4,70	4,50	4,55
p_H	6,40	5,60	5,40	5,36	5,38	5,80	6,05	6,40	6,85	7,60

jeweils 0,005%ige Suspensionen von Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz in Phosphatpuffer $p_H = 6{,}8$, denen so viel H_2O_2 zugesetzt wurde, daß $^1/_{100}$ mol H_2O_2 vorhanden war. Diese Konzentration verwendeten *Fujita* und *Kodama* (1931), da sie fanden, daß der exakt meßbare Konzentrationsbereich der Sauerstoffabspaltung bei manometrischen Sauerstoffbestimmungen zwischen 0,0025 und 0,025 mol. H_2O_2 liegt.

Tabelle III gibt eine Übersicht über einige Versuchsreihen, die in verschiedenen Zeiträumen jeweils mit frisch hergestellten Trockensubstanzen angesetzt wurden. Es ist daraus ersichtlich, daß, berechnet auf die in der Versuchszeit (30 Minuten) insgesamt entwickelte Sauerstoffmenge, die Chloroplastensubstanz etwa doppelt so stark wirksam ist wie die Cytoplasmasubstanz, auf die Einheit des Trockengewichtes bezogen. Die wasserlösliche Substanz, die mit Na O H auf den p_H-Wert 6,8 gebracht war, zeigte fast gar keine Wirksamkeit.

Tabelle III. Katalase.
Suspensionen je 0,005%; Restfiltrat (wasserlösliche Substanz) 7 ccm. Versuchsdauer 30 Minuten. $t = 20^0$; $p_H = 6{,}8$; m/100 H_2O_2.

Substanzen	V_{O_2} in cmm				1 mg Trockengewicht entwickelt
	I	II	III	Mittel	cmm
Chloroplastensubstanz ..	176	171	177	174,65	499,00
Cytoplasmasubstanz	87	95	93	91,65	261,85
Wasserlösliche Substanz .	71	70	68	69,65	0,75
Chloroplastensubstanz ..	149	156	145	150	428,60
Cytoplasmasubstanz	79	75	82	78,65	224,70
Wasserlösliche Substanz .	50	46	51	49	0,50
Chloroplastensubstanz ..	164	172	171	169	482,85
Cytoplasmasubstanz	88	85	79	84	240,00
Wasserlösliche Substanz .	87	93	88	89,35	0,95
Chloroplastensubstanz ..	138	144	135	139	397,15
Cytoplasmasubstanz	69	67	71	69	197,15
Wasserlösliche Substanz .	66	59	60	61,65	0,65

Da in Tabelle III nur die in 30 Minuten insgesamt entwickelte Sauerstoffmenge berücksichtigt ist, wurden in Abb. 1 die Werte für die Sauerstoffentwicklung nach je 10 Minuten eingetragen. Die Kurven zeigen deutlich, daß die Chloroplastensubstanz das Hydroperoxyd in den ersten 10 Minuten stürmisch zersetzt, während die Spaltung in den folgenden 20 Minuten weitaus geringer ist. Die Cytoplasmasubstanz zeigt eine wesentlich langsamere Sauerstoffentwicklung, die zwar ebenfalls in den ersten 10 Minuten am größten ist, dann aber langsamer zurückgeht.

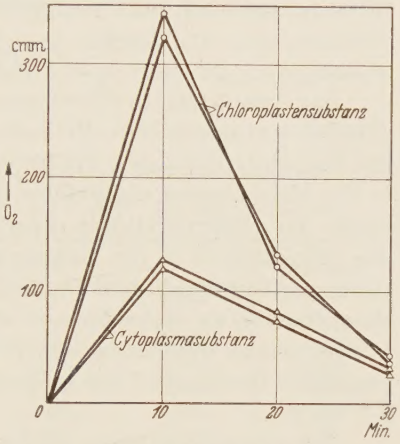

Abb. 1. Katalase.
Kurven für Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz. Versuche von Oktober 1937 und Juni 1938; Suspensionen je 0,005 %ig; $t = 20^0$; $p_H = 6{,}8$; Versuchsdauer: 30 Min.

Von großer Wichtigkeit ist es, für alle Bestimmungen stets frisch hergestellte Fermentpräparate zu benutzen. Dieselben Trockensubstanzen wurden sofort nach der Herstellung und nach längerem Lagern untersucht mit dem Ergebnis, daß schon nach kurzer Zeit die Enzymwirksamkeit erheblich nachläßt, auch wenn die Substanzen nach Entnahme der jeweils benötigten Menge sofort wieder in Reagensgläser eingeschmolzen und im Dunkeln aufbewahrt wurden (Tabelle IV). Die hohe katalatische Wirksamkeit der Chloroplastensubstanz nimmt also beim Lagern der Trockensubstanz schnell ab, während die geringere

Tabelle IV. Die katalatische Wirksamkeit getrockneter Präparate in Abhängigkeit von deren Alter.

Versuchsdauer 30 Minuten. Suspensionen je 0,005 %ig. $t = 20^0$; $p_H = 6{,}8$; m/100 H_2O_2.

Alter der Substanzen in Tagen	Substanzen	V_{O_2} in cmm				1 mg Trockengewicht entwickelt
		I	II	III	Mittel	cmm
0	Chloroplastensubstanz .	149	156	145	150,00	428,60
	Cytoplasmasubstanz ...	79	75	82	78,65	224,70
3	Chloroplastensubstanz .	111	106	112	109,65	313,30
	Cytoplasmasubstanz ...	53	57	51	53,65	153,30
10	Chloroplastensubstanz .	25	31	26	27,35	78,15
	Cytoplasmasubstanz ...	14	14	15	14,35	41,00
13	Chloroplastensubstanz .	19	17	17	17,65	50,45
	Cytoplasmasubstanz ...	8	10	11	9,65	27,55
21	Chloroplastensubstanz .	11	12	9	10,65	30,45
	Cytoplasmasubstanz ...	6	5	6	5,65	16,15

der Cytoplasmasubstanz nur langsam zurückgeht. Es ist beachtenswert, daß sich die Katalase im Autolysat gerade umgekehrt verhielt und noch nach Monaten fast dieselbe Aktivität wie zu Beginn der Autolyse nachgewiesen werden konnte.

Aus den Versuchen ergibt sich also, daß nur Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz eine starke Katalasewirkung zeigen. Das Restfiltrat, enthaltend die wasserlösliche Substanz, ist nahezu unwirksam.

II. Peroxydase.

Zur quantitativen Bestimmung der Peroxydase wurde die von *Willstätter* ausgearbeitete Methode angewendet, nach der die Leukobase des Malachitgrüns durch Hydroperoxyd in Gegenwart von Peroxydase in das Malachitgrün übergeführt wird. Nach Beendigung der Versuche wurde das Chlorophyll mit peroxydfreiem Äther ausgeschüttelt, wobei das Malachitgrün in der Lösung zurückblieb. Die photometrische Bestimmung wurde mit dem *Pulfrich*-Photometer unter Vorschalten eines Blaufilters (S 43, Schwerpunkt 430 mμ) ausgeführt. Nach dem Einbringen der zu untersuchenden Flüssigkeiten in das mit Natriumacetat gepufferte Essigsäure-Leukomalachitgrüngemisch war der p_H-Wert stets 3,7 bis 3,8.

Peroxydase konnte nur im Restfiltrat, enthaltend die wasserlösliche Substanz, nachgewiesen werden. Tabelle V zeigt eine Versuchsreihe, die mit demselben Restfiltrat in Zeitabständen bis zu 5 Monaten durchgeführt ist. Es ist daraus ersichtlich, daß, abgesehen von einer geringen Inkonstanz der Zahlenwerte, die auch schon von *Willstätter* (1928) beobachtet wurde, erst nach etwa 5 Monaten die Wirksamkeit der Peroxydase etwa auf die Hälfte zurückgegangen ist.

Bei der Untersuchung der Trockensubstanz des Rückstandes von der Darstellung der Zellbestandteile, enthaltend die Zellwandsubstanz, konnten noch größere Mengen Peroxydase nachgewiesen werden, trotzdem die durch Auswaschen des Rückstandes erhaltenen Auszüge keine Peroxydasewirkung mehr zeigten.

Tabelle V. Peroxydase.
Versuchsdauer 5 Minuten. $t = 20^0$; $p_H = 3{,}7$; 10 ccm Restfiltrat (wasserlösliche Substanz).

Alter in Tagen	Malachitgrün in mg				p_H
	1	2	3	Mittel	
0	1,044	1,112	1,061	1,072	3,60
1	0,802	0,913	0,856	0,857	3,58
2	0,789	0,770	0,810	0,789	3,58
3	0,822	0,868	0,790	0,826	3,55
30	0,921	0,967	0,931	0,939	3,51
90	0,761	0,783	0,714	0,749	3,48
150	0,547	0,603	0,559	0,569	3,52

Autolysate von Blätterextrakten wurden ebenfalls auf Peroxydasewirksamkeit untersucht. Aus Tabelle VI geht hervor, daß die Peroxydase im Verlauf der Autolyse zerstört wird. Es scheint dies mit dem Ansteigen des p_H-Wertes zusammenzuhängen; denn in einem mit Winterspinat ausgeführten Autolyseversuch, dessen p_H-Wert erst nach zwei Monaten auf 6,0 gegenüber einem p_H-Wert von etwa 7,0 bei Sommerspinat gestiegen war, konnten auch nach dieser Zeit noch merkliche Mengen Peroxydase nachgewiesen werden. Während sich die Peroxydase in saurem Medium (Restfiltrat) monatelang gut wirksam hält, tritt scheinbar in einem Medium, dessen p_H-Wert über 6,0 liegt, bald eine vollkommene Zerstörung des Ferments ein.

Tabelle VI. Peroxydase, Autolysat von Blätterextrakt.
Versuchsdauer 5 Minuten. $t = 20^0$; $p_H = 3{,}7$; 10 ccm Autolysat.

Alter des Autolysats in Tagen	Malachitgrün in mg				Autolysat p_H
	1	2	3	Mittel	
0	1,227	1,074	1,153	1,151	6,40
1	0,942	0,913	0,886	0,914	5,60
2	0,637	0,721	0,756	0,705	5,40
6	0,663	0,673	0,624	0,653	5,36
8	0,430	0,482	0,461	0,458	5,38
14	0,212	0,191	0,203	0,202	5,80
21	0,096	0,087	0,101	0,095	6,05
30	0,057	0,061	0,077	0,065	6,40
60	Spuren	0	0	0	6,85
120	0	0	0	0	7,60

III. Chlorophyllase.

Die Versuche wurden ausgeführt nach den Angaben *Willstätters* (1929) für die hydrolytische Spaltung des Chlorophylls, wie sie auch in der Arbeit von *Mayer* (1930) in der Hauptsache zur Verwendung gelangte. Nach dem Abbrechen der Versuche und Überführen der Farbstoffe in peroxydfreien Äther wurden die Phaeophorbide durch Ansäuern in Freiheit gesetzt und photometrisch bestimmt. Das Photometrieren wurde mit dem *Pulfrich*-Photometer vorgenommen und hieraus die Umsatzzahl u berechnet, die angibt, wieviel Prozent von dem zugesetzten Chlorophyll gespalten sind.

Um geeignete Substanzsuspensionen zu erhalten, wurde die Methode in einigen Punkten derart abgeändert, daß die chlorophyllfreien Substanzen in 10 ccm Phosphatpuffer $p_H = 6{,}0$ suspendiert, mit einer Lösung von 8 mg reinem Chlorophyll $(a + b)$ in 20 ccm wasserfreiem Aceton versetzt und im Thermostaten mit Schüttelvorrichtung 3 Stunden bei 25^0 geschüttelt wurden. Die Temperatur und der p_H-Wert entsprach den Angaben von *Mayer* (1930).

Die Untersuchung der einzelnen Zellfraktionen ergab ein vollkommen einheitliches Bild: nur die Chloroplastensubstanz bewirkte eine Hydrolyse des zugesetzten Chlorophylls.

Ferner wurde zur Prüfung, ob die Chlorophyllase beim Ausbleichen der Blätter in eine andere Fraktion wandert, Spinat verarbeitet, der im Anfang der Vergilbung stand. Auch hier war die Chlorophyllasewirksamkeit, in geringerem Maße vorhanden, auf die Chloroplastensubstanz beschränkt. Die Chlorophyllase scheint also bei weiter fortschreitender Vergilbung zerstört bzw. inaktiviert zu werden. Tabelle VII zeigt, daß die Umsatzzahlen im Juli und bei Beginn der Vergilbung sinken, wie dies auch schon *Mayer* (1930) bei seinen Untersuchungen mit Blattmehlen gefunden hat.

Tabelle VII. Chlorophyllase.

0,5 g chlorophyllfreie Chloroplastensubstanz; 8 mg Chlorophyll ($a + b$); 20 ccm Aceton; 10 ccm Pufferlösung; $p_H = 6{,}0$; Versuchsdauer 3 Std.; $t = 25^0$

Datum	16. VI. 1938			18. VI. 1938			3. VII. 1938			15. VII. 1938			Bei Beginn der Vergilbung			
Versuch	1	2	Mittel	1	2	Mittel	1	2	Mittel	1	2	Mittel	1	2	3	Mittel
u	56	55	55,5	54	55	54,5	51	53	52	48	49	48,5	33	32	34	33

Es ist nicht anzunehmen, daß die Chlorophyllase durch das Verfahren der Darstellung der Zellsubstanzen an die Chloroplastensubstanz adsorbiert wird. Denn es gelang *Willstätter* (1910) erst beim Abpressen des frischen Blattbreies unter 250 Atm. Druck einen Teil der Chlorophyllase zu isolieren. *Mayer* (1930), der diese Angaben *Willstätters* weiterverfolgte und das Zerreiben der Blätter mit einem Zusatz von Calciumcarbonat und verschieden stark gepufferten Lösungen ausführte und den Blattbrei nach mehrtägiger Autolyse unter 350 Atm. Druck abpreßte, konnte ebenfalls nur einen geringen Chlorophyllasegehalt des Preßsaftes nachweisen. Er erzielte auch dadurch keine Steigerung der Wirksamkeit, daß er chlorophyllasehaltigen Preßsaft sowie eine Aufschwemmung destruierter Chloroplasten mit verschiedenen Adsorbentien wie Talkum, Kaolin oder frisch bereitetem Aluminiumhydroxyd C schüttelte.

Der bei der Darstellung der Zellbestandteile erhaltene Rückstand, enthaltend die Zellwandsubstanz, bewirkte eine Spaltung zugesetzten Chlorophylls, die jedoch abnahm, je mehr bei der Reinigung die Grünfärbung verschwand. Es ist sicher, daß diese Chlorophyllasewirkung wie im Falle der Katalase durch noch im Rückstand enthaltene Zellen bzw. Chloroplastenfragmente bewirkt wurde.

IV. Amylase.

Der Nachweis der Amylase erfolgte nach der *Wohlgemuth*schen Dextrinierungsmethode (1908), die in Anbetracht des geringen Amylase-

gehalts der Substanzen etwas abgeändert wurde. So mußten die Versuche von 24 auf 48 Stunden ausgedehnt werden. Die Versuchsansätze wurden deshalb mit Thymol versetzt, das nach Untersuchungen *Sjöbergs* (1922) keinen Einfluß auf die Amylasewirkung ausübt. Für die zu jedem Versuch frisch mit Pufferlösung hergestellten Stärkelösungen wurde „lösliche Stärke *Kahlbaum*" benutzt. Cytoplasma- und Chloroplastensubstanz wurden im Essigsäureacetat-Puffergemisch ($p_H = 5{,}0$) suspendiert. Das Restfiltrat (wasserlösliche Fraktion) wurde mit NaOH auf den p_H-Wert von 5,0 gebracht. Es gelangten immer je 20 ccm Suspension und 50 bis 100 ccm Restfiltrat mit der gleichen Menge 0,1 %iger Stärkelösung verdünnt zur Anwendung. Die Versuche wurden bei 40° ausgeführt, die Gläser nach Beendigung in Eiswasser gestellt und mit je 10 ccm verdünnter HCl versetzt. Zu den klaren, wenig gefärbten Filtraten wurde tropfenweise n/20 Jodlösung hinzugegeben.

Wohlgemuth bezeichnet als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) das Gläschen, welches die violette Farbe zeigt. Die diastatische Kraft für 1 ccm Fermentlösung bezeichnet er mit D und gibt bei jedem Versuch gleichzeitig die Temperatur und die Zeit an, bei der gearbeitet wurde. Unter Berücksichtigung der Abänderungen der Methode gibt die Bezeichnung $D^{40^0}_{48\ \text{Std.}}$ also an, wieviel ccm 0,1 %ige Stärkelösung in 48 Stunden bei 40° durch 1 g Trockengewicht Chloroplastensubstanz zu Erythrodextrin abgebaut werden.

Die einzelnen Fraktionen aus den Spinatblättern zeigten eine große Reduktionsfähigkeit gegenüber Jod. Diese ist wahrscheinlich durch die Anwesenheit von Ascorbinsäure bedingt. Es sind deswegen mehr als 1 bis 2 Tropfen Jodlösung hinzuzugeben, um eine konstante Blau- oder Rotfärbung zu erzielen. Ferner war zu beachten, daß die Reduktionsfähigkeit durch längeres Kochen merklich erhöht wurde, weshalb die Kontrollen nur kurz bis zum Kochen erhitzt wurden. Dies berichten auch *Mc Henry* und *Graham* (1935) in einer Arbeit über die Bestimmung der Ascorbinsäure durch Titration: „. . . we observed that in the case of cauliflower, carrots, parsnips, beets and potatoes, the titration value was higher in the cooked than in the raw food", und vermuten, daß: „. . . this amount is augmented by hydrolysis caused by heating". Nach *Holtz* (1940) ist in tierischen Geweben und in zellfreien tierischen Organextrakten ein durch Salzsäure oder proteolytische Fermente spaltbarer Ascorbinsäure-Eiweißkomplex vorhanden[1].

[1] *Anmerkung bei der Korrektur.* Ob die durch Kochen bewirkte Erhöhung der Reduktionsfähigkeit in erster Linie auf Freilegung von Ascorbinsäure beruht, dürfte durch die Untersuchungen von *Wachholder* und *Okrent* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **264**, 254, 1940) fraglich geworden sein, die damit die Angaben von *Fujita* und *Ebihara* (diese Zeitschr. **301**, 229, 1939) bestätigen.

Bei der Untersuchung der Fraktionen wurde nun gefunden, daß nur Suspensionen von Chloroplastensubstanz einen Stärkeabbau bewirken. Weder in starken Cytoplasmasuspensionen, noch in Restfiltratmengen von 50 bis 100 ccm konnte eine Dextrinierung nachgewiesen werden, auch dann nicht, wenn die Versuche auf 3 oder 4 Tage ausgedehnt wurden (Tabelle VIII).

Tabelle VIII. Amylase.

20 ccm Stärkelösung (0,1 %ig); Versuchsdauer 48 Stunden; $p_H = 4{,}95$; $t = 40^0$.

g Trockengewicht	Färbung nach Jodzusatz					
Chloroplastensubstanz	1	2	3	4	5	Mittel
0,45	blau	blau	blau	blau	blau	
0,50	blauviolett	„	„	rotviolett	„	
0,55	rotviolett	blauviolett	rotviolett	rot	hellblau	
0,60	rot	rotviolett	rot	gelbrot	blauviolett	
0,65	gelbrot	rot	gelb	gelb	rotviolett	
0,70	gelb	gelb	„	„	rot	
$D^{40^0}_{48\,h}$	33,4	30,8	33,4	36,4	28,6	32,5

In einer Versuchsreihe wurden zum Vergleich Chloroplastensubstanzen, die ein Jahr alt und als Trockensubstanzen in Reagensgläser eingeschmolzen waren, benutzt. Auch diese Chloroplastensubstanzen hatten noch eine deutliche Amylasewirkung.

Die Untersuchung des bei der Darstellung der Zellsubstanzen erhaltenen Rückstandes, enthaltend die Zellwandsubstanz, ergab offenbar aus den schon S. 361 und 366 angeführten Gründen noch Amylasewirkung.

Die Autolysatuntersuchung ergab schon nach 3 Tagen einen Anstieg der Fermentwirksamkeit, die am größten nach 4 Wochen war. Auch wurde die Amylase im weiteren Verlauf der Autolyse nicht zerstört, sondern ließ sich noch nach einem Jahr mit Sicherheit nachweisen (Tabelle IX). Der Anstieg der amylatischen Wirksamkeit ist vielleicht

Tabelle IX. Amylase, Autolysat von Blätterextrakt.

30 ccm Stärkelösung (0,1 %ig); $p_H = 4{,}95$; 30 ccm Autolysat; Versuchsdauer: 96 Stunden; $t = 40^0$.

Alter des Autolysats	Färbung nach Jodzusatz		
	1	2	3
24 Std.	blauviolett	blau	rotviolett
3 Tage	rotviolett	rotviolett	rot
1 Woche	„	rot	„
3 Wochen	rot	gelbrot	gelbrot
4 Wochen	gelbrot	„	gelb
1 Jahr	rotviolett	rot	rotviolett

abgesehen von einer Enzymfreilegung durch Proteolyse, auf Zerstörung der Ascorbinsäure im Laufe der Autolyse zurückzuführen, da nach *Weidenhagen* (1936) und *Janicki* (1939) Gersten- und Weizenamylase durch Ascorbinsäure infolge einer Dehydrierung der letzteren reversibel gehemmt werden.

V. Saccharase.

Aus Gründen, die bereits *Nurmia* (1935) dargelegt hat, eignet sich zum Nachweis des durch Saccharasewirkung entstandenen Invertzuckers in Blattmehlen und -substanzen am besten die Methode der Zuckerbestimmung von *Bertrand*. Der Ansatz und die Aufarbeitung der Versuche wurden nach der von *Nurmia* angegebenen Methode ausgeführt. Die Substanzen wurden in 80 ccm Essigsäureacetatpuffer (p_H — 6,10) suspendiert und nach Zugabe von 20 ccm 5 %iger Saccharoselösung in einen Wasserthermostaten von 30° eingesetzt. Nach 1, 2, 3 usw. Tagen wurde in je 20 ccm der Versuche und der Kochsaftkontrollen die gebildete Menge Invertzucker bestimmt, nachdem zum Erzielen klarer Lösungen etwas neutrales Bleiacetat hinzugegeben und das Blei mit Dinatriumphosphat entfernt worden war.

Die Saccharase war in allen Fraktionen nachzuweisen. Die größte Wirksamkeit zeigte die Cytoplasmasubstanz, etwa halb so wirksam war die Chloroplastensubstanz und die geringste Wirkung zeigte das Restfiltrat (wasserlösliche Fraktion) (Tabelle X). Die Werte (mg Invertzucker) wurden auf 0,1 g Trockengewicht umgerechnet, das Restfiltrat auf 10 ccm.

Nurmia (1935) untersuchte u. a. die Wirksamkeit von Blattmehlen aus Blättern, deren Mittelrippen entfernt waren, und aus Blattrippen und kommt zu dem Schluß, daß der Sitz der Saccharase in erster Linie in den Blattrippen und -stielen ist. Es wurden deshalb Extrakte aus gleichen Mengen Blättern, Blattrippen und Blättern ohne Rippen

Tabelle X. Saccharase.

$p_H = 6{,}10$; $t = 30°$.

Untersuchung nach	0,1 g Cytoplasmasubstanz				0,1 g Chloroplastensubstanz				10 ccm Restfiltrat (wasserlösliche Substanz)			
	1	2	3	Mittel	1	2	3	Mittel	1	2	3	Mittel
23 Std.	60	50	54	54	31	35	30	32	3	5	3	4
47,5 „	85	74	70	76	63	59	59	60	6	6	5	6
69,5 „	187	157	150	164	96	103	102	100	11	14	21	15
94,5 „	308	295	290	298	133	143	141	139	27	32	36	32
116 „									40	47	49	45

(mg Invertzucker)

Tabelle XI. Saccharase.

I = 10 ccm Blätterextrakt. II = 10 ccm Blattrippenextrakt.
III = 10 ccm Extrakt aus Blättern ohne Rippen.
$p_H = 6{,}10$; $t = 30^0$.

Untersuchung nach	I				II				III			
	1	2	3	Mittel	1	2	3	Mittel	1	2	3	Mittel
23 Std.	124	127	155	135	119	112	110	113	47	43	48	46
47,5 „	259	252	248	253	187	167	171	175	85	84	91	87
69,5 „	435	456	423	438	391	308	357	352	138	140	143	140
94,5 „	653	720	660	678	604	556	636	599	165	160	167	164

(mg Invertzucker)

hergestellt und in ihrer Wirkung verglichen (Tabelle XI). Dabei fanden die Angaben *Nurmias* ihre Bestätigung: denn die Extrakte aus Blättern und Rippen sind stark wirksam, der Extrakt aus den Blättern ohne Rippen dagegen weit weniger. Dies Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit dem Befund, daß die Saccharase in größerer Menge in der Cytoplasmasubstanz gefunden wurde, denn bei der Essigsäurefällung der Extrakte aus Blattrippen wurden größere Mengen Cytoplasma- als Chloroplastensubstanz erhalten, während die Fällung der Blätterextrakte stets mehr Chloroplasten- als Cytoplasmasubstanz ergeben. Es ist daher zu vermuten, daß die größere Wirksamkeit der Rippen darauf beruht, daß diese mehr Cytoplasma- als Chloroplastensubstanz enthalten.

Auch im Rückstand der Darstellung der Zellbestandteile (Zellwandsubstanz) war Saccharasewirkung nachzuweisen (s. oben).

Während der Autolyse zeigte sich ähnlich wie im Falle der Amylase ein Anstieg des Spaltungsvermögens gegenüber Rohrzucker mit einem Maximum nach 3 Wochen (Tabelle XII). Die Ursache hierfür dürfte auch hier in erster Linie auf Zerstörung der Ascorbinsäure zurückzuführen sein, da nach *Weidenhagen* (1936) die β-h-Fructosidase, aus Hefe isoliert, durch Ascorbinsäure reversibel gehemmt wird.

Tabelle XII. Saccharase. Autolysat von Blätterextrakt.
$p_H = 6{,}10$; $t = 30^0$.

Untersuchung nach	Alter des Autolysats					
	24 Std.	72 Std.	7 Tage	14 Tage	3 Wochen	4 Wochen
23 Std.	60	95	233	268	162	148
47,5 „	100	120	305	340	442	200
69,5 „	112	135	333	378	568	384
94,5 „	128	157	421	496	734	621

(mg Invertzucker)

Besprechung der Ergebnisse.

Die vorliegende Untersuchung kann nur einen orientierenden Überblick über die Fermentverteilung in den untersuchten Zellfraktionen geben (s. Tabelle XIII). Denn, abgesehen von der Tatsache, daß der Chloroplastensubstanz nach den Angaben von *Menke* noch gewisse Mengen Cytoplasmasubstanz beigemischt sind, kann nicht entschieden werden, ob bei der Darstellung der Fraktionen nicht teilweise sekundäre Adsorptionen von Fermenten an andere Fraktionen stattfinden und unter Umständen Abspaltungen eines Co-Ferments bei der Aufarbeitung eine Rolle spielen.

Tabelle XIII. Fermentaktivität in den untersuchten Fraktionen.

	Katalase	Peroxydase	Chlorophyllase	Amylase	Saccharase
Chloroplastensubstanz..	++	−	+	+	+
Cytoplasmasubstanz ...	+	−	−	−	++
Wasserlösliche Substanz	Spuren	+	−	−	gering

Daß Katalase sowohl in der Chloroplasten- als auch in der Cytoplasmasubstanz gefunden wurde, und zwar mehr in der Chloroplastensubstanz, steht damit im Einklang, daß die Katalase sowohl für die Atmung als auch für die Photosynthese als mitwirkendes Enzym anerkannt wird. Die größere katalatische Wirkung der Chloroplastensubstanz könnte mit der Tatsache zusammenhängen, daß die Assimilationsleistung die Atmungsleistung bei weitem übersteigt. Nach *Menke* ist das mengenmäßige Verhältnis von Chloroplastensubstanz zu Cytoplasmasubstanz = etwa 2 : 1; demnach ist die Chloroplastensubstanz katalatisch ungefähr viermal wirksamer als die Cytoplasmasubstanz. Tatsächlich sind die Chloroplasten noch wirksamer, da, wie erwähnt, der untersuchten Chloroplastensubstanz noch Cytoplasmasubstanz beigemischt ist.

Die Behauptung einer Mitwirkung der Katalase bei der Photosynthese als eines Ferments, das den Assimilationssauerstoff freisetzt, ist allerdings nicht unbestritten geblieben. So glaubt *Gaffron* (1939), daß ein von Wasserstoffperoxyd verschiedenes Peroxyd die Quelle des Assimilationssauerstoffs darstellt und von einem Ferment gespalten wird, das sich von der Katalase, wenn auch vielleicht nur im Eiweißträger, unterscheidet. Die vorliegenden Versuche sprechen jedoch mehr für die Beteiligung eines wasserstoffperoxydspaltenden Ferments bei der Photosynthese, ungeachtet der theoretischen Erwägungen von *Wohl* (1937), nach denen das Entstehen von Wasserstoffperoxyd bei der Photosynthese aus energetischen Gründen nicht möglich sein soll. Fernerhin schreibt *Gaffron* der Katalase lediglich die Funktion einer

Entgiftung des bei Dehydrierungsvorgängen auftretenden Wasserstoffperoxyds zu, gegen welches der Assimilationsapparat in der Tat sehr empfindlich ist. In Anbetracht der Geringfügigkeit der Atmung gegenüber der Photosynthese ist es jedoch auf dieser Grundlage nicht einzusehen, weshalb die Chloroplasten besonders große Katalasemengen enthalten.

Interessant ist, daß die Peroxydase nur in der wasserlöslichen Fraktion gefunden wurde. Unter der allerdings nicht bewiesenen Voraussetzung, daß bei der Herstellung der Chloroplastensubstanz keine Fermentelution stattgefunden hat, würde dies besagen, daß die Peroxydase an der Photosynthese nicht beteiligt ist. Eine Elution der Peroxydase ist jedoch nicht wahrscheinlich, da *Willstätter* (1928) bei der Darstellung seiner hochgereinigten Peroxydasepräparate erst nach Dialyse und Fällung mit Oxalsäure und Bariumhydroxyd wirksame Preßsäfte erhielt.

Da der Chlorophyllabbau und eventuell auch die Chlorophyllsynthese durch die Chlorophyllase reguliert wird, ist die Tatsache verständlich, daß dieses Ferment nur in der Chloroplastensubstanz zu finden ist. Dadurch wird der Befund von *Mayer* (1930), der, ohne auf die Frage der Verteilung des Ferments einzugehen, ebenfalls eine starke Chlorophyllasewirksamkeit von Chloroplastensubstanzen fand, bestätigt.

Daß Amylase nur in der Chloroplastensubstanz gefunden worden ist, steht gut mit der Tatsache im Einklang, daß die Stärke in den Chloroplasten lokalisiert ist und dort den bekannten Abbauvorgängen unterliegt. Und ebenso ist es verständlich, daß sich die Hauptmenge der Saccharase in der Cytoplasmasubstanz befindet, da der Rohrzucker sich aller Voraussetzung nach in der größten Menge im Cytoplasma bzw. in den Vakuolen befindet, wobei natürlich zu berücksichtigen ist, daß bei der Fällung der Cytoplasmasubstanz ein etwa in den Vakuolen vorhandener Saccharaseanteil mit ausgefällt wird und somit über den Saccharasegehalt der wasserlöslichen Fraktion nichts ausgesagt werden kann.

Zusammenfassung.

Die Möglichkeit, den Zellinhalt grüner Blätter in die Fraktionen Chloroplastensubstanz, Cytoplasmasubstanz, wasserlöslichen Anteil und Zellwandsubstanz präparativ zu zerlegen, wurde zu einem Versuch der Lokalisationsbestimmung einiger Fermente in den Blattzellen des Spinats benutzt.

Starke Katalasewirkung fand sich in Chloroplasten- und Cytoplasmasubstanz; die wasserlösliche Fraktion war katalatisch nahezu unwirksam.

Peroxydatisch wirksam erwies sich nur die wasserlösliche Fraktion.

Chlorophyllatisch und amylatisch wirksam war nur die Chloroplastensubstanz.

Saccharasewirkung war dagegen in allen drei Fraktionen vorhanden, in der wasserlöslichen Fraktion allerdings nur in geringem Maße.

Die Zellwandfraktion enthielt sämtliche der untersuchten Fermente, wenn auch nur in geringer Menge. Dies ist wohl größtenteils auf die Beimischung nicht aufgeschlossener Zellen zurückzuführen.

Während der Autolyse stieg die Wirksamkeit der Amylase und der Saccharase, was auf Zerstörung der diese Enzyme reversibel hemmenden Ascorbinsäure zurückzuführen sein dürfte.

Herrn Professor Dr. *K. Noack* danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für Überlassung von Mitteln seitens der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Ebenso danke ich Herrn Dr. *W. Menke* für seine Unterstützung.

Literatur.

Fujita, A., u. *T. Kadama*, diese Zeitschr. **232**, 15, 1931. — *Dieselben*, ebenda **232**, 20, 1931. — *Gaffron, H.*, Ann. Rev. of Biochem. **8**, 483, 1939. — *Mc Henry, E. W.*, u. *M. Graham*, Biochem. J. **29**, 2013, 1935. — *Holtz, P.*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **263**, 187, 1940. — *Janicki, J.*, Enzymologia **7**, 182, 1939. — *Mayer, H.*, Planta **11**, 294, 1930. — *Menke, W.*, Zeitschr. f. Bot. **32**, 273, 1937. — *Derselbe*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **257**, 43, 1939. — *Noack, K.*, diese Zeitschr. **183**, 136, 1927. — *Nurmia, M.*, Transformation of sugars in plants. Helsinki 1935. — *Sjöberg, K.*, diese Zeitschr. **133**, 218, 1922. — *Warburg, O.*, Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin 1926. — *Weidenhagen, R.*, Zeitschr. Wirtschgr. Zuckerind. **86**, 240, 1936. — *Derselbe*, ebenda **86**, 482, 1936. — *Willstätter, R.*, u. *A. Stoll*, Ann. d. Chem. **378**, 52, 1910; Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin 1927. — *Willstätter, R.*, Untersuchungen über Enzyme. Berlin 1928. — *Wohl, K.*, Zeitschr. f. physik. Chem. B, **37**, 209, 1937. — *Wohlgemuth, J.*, diese Zeitschr. **9**, 1, 1908.

Lebenslauf

Am 5. August 1908 wurde ich, Gerhard Krossing, in Rostock in Mecklenburg als Sohn des Stadtinspektors a. D. Willy Krossing und seiner Ehefrau Emma geb. Römmer, geboren.

In meiner Heimatstadt besuchte ich die Oberrealschule und das Realgymnasium. Nach Ablegung der Reifeprüfung trat ich in Rostock in den Apothekerberuf ein. Nach zwei Jahren Praktikantentätigkeit bestand ich das pharmazeutische Vorexamen und war dann zwei Jahre in Berlin als Apothekerassistent tätig. Daran anschließend studierte ich an der Universität Berlin zuerst Pharmazie und dann weiterhin Naturwissenschaften. Das Pharmaziestudium beendete ich mit dem Bestehen des Staatsexamens im März 1936. Im Oktober 1939 erhielt ich die Bestallung als Apotheker.

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig
Printed in Germany